

痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系中生产细胞的选择

舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松

舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松, 南方医科大学抗体工程研究所 广东省广州市 510515

舒文, 南方医科大学在读硕士, 主要从事丙型肝炎病毒体外大规模培养技术的研究平台的建立及疫苗的实验室研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872244

作者贡献分布: 实验设计由吴英松与舒文完成; 研究过程由舒文与林冠峰完成; 数据整理, 统计分析及文章写作由舒文完成; 马强指导实验; 文章审阅由马强与吴英松完成; 实验试剂准备由董慧敏完成。

通讯作者: 吴英松, 教授, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学抗体工程研究所. wg@fimmu.com

电话: 020-61648321

收稿日期: 2009-06-20 修回日期: 2009-08-27

接受日期: 2009-09-07 在线出版日期: 2009-10-08

Selection of cell lines for production of recombinant hepatitis C virus using the vaccinia virus expression system

Wen Shu, Qiang Ma, Hui-Min Dong, Guan-Feng Lin, Ying-Song Wu

Wen Shu, Qiang Ma, Hui-Min Dong, Guan-Feng Lin, Ying-Song Wu, Institute of Antibody Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872244

Correspondence to: Professor Ying-Song Wu, Institute of Antibody Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. wg@fimmu.com

Received: 2009-06-20 Revised: 2009-08-27

Accepted: 2009-09-07 Published online: 2009-10-08

Abstract

AIM: To compare the yield of recombinant hepatitis C virus (HCV) in different cell lines.

METHODS: BHK-21, HepG2 and SMMC7721 cells were co-transfected with recombinant plasmid pT7HCV and pVHCV, respectively, followed by infection with vTF7-3 vaccinia viruses. Ninety-six hours later, the presence of HCV RNA in culture supernatants was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The titers of HCV were measured by fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR). The expression of HCV antigens was detected by West-

ern blot.

RESULTS: HCV RNA was detectable in all culture supernatants. The titers of HCV in BHK-21, HepG2 and SMMC7721 cells were $(2.97 \pm 0.28) \times 10^7$, $(1.99 \pm 0.17) \times 10^5$, $(1.19 \pm 0.17) \times 10^5$ (copies/mL), respectively. The expression of HCV E2, NS3 and NS5 antigens could be detected in all the three cell lines.

CONCLUSION: Recombinant HCV can be produced in BHK-21, HepG2 or SMMC7721 cells. The yield of recombinant HCV is highest in BHK-21 cells.

Key Words: Hepatitis C virus; Vaccinia virus; Fluorescent quantitative PCR

Shu W, Ma Q, Dong HM, Lin GF, Wu YS. Selection of cell lines for production of recombinant hepatitis C virus using the vaccinia virus expression system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(28): 2877-2880

摘要

目的: 探讨痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒制备体系中生产细胞的选择。

方法: 将已构建好的质粒pT7HCV及pVHCV分别共转染BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞株, 4 h后用痘苗病毒感染细胞, 96 h后用RT-PCR检测HCV的RNA表达, 用荧光定量PCR方法检测培养上清中RNA的拷贝数, 并用Western blot检测结构蛋白E2以及非结构蛋白NS5的表达。

结果: RT-PCR检测到各细胞株培养上清中均有HCV的RNA的存在, 定量PCR显示RNA的拷贝数在BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞中的产量分别为 $(2.97 \pm 0.28) \times 10^7$, $(1.99 \pm 0.17) \times 10^5$, $(1.19 \pm 0.17) \times 10^5$ (copies/mL)。Western blot检测到在这3种生产细胞中均有HCV非结构蛋白NS5的表达。

结论: BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞株均可

■背景资料

丙型肝炎病毒(HCV)体外不易培养, 导致HCV药物研发进展缓慢。本研究拟通过优化痘苗病毒辅助生产体系达到规模化体外培养HCV病毒颗粒的目的。

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研发前沿

目前该领域的研究热点是如何建立HCV大规模体外培养体系,为药物的研发以及疫苗的研制提供条件。目前,关于HCV感染的机制、复制的方式还存在许多尚未解决的问题。

生产出重组丙型肝炎病毒颗粒,且以BHK₂₁为生产细胞株时产量最高。

关键词: 重组丙型肝炎病毒; 痘苗病毒; 荧光定量聚合酶链式反应

舒文, 马强, 董慧敏, 林冠峰, 吴英松. 痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系中生产细胞的选择. 世界华人消化杂志 2009; 17(28): 2877-2880

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2877.asp>

0 引言

HCV感染是慢性肝病和肝癌的主要致病原因之一。然而,由于缺乏有效的HCV体外培养体系,针对HCV的药物研发工作进展受到严重制约,目前还没有一种可以用于广泛接种预防HCV的特异性药物投入生产。本实验室目前已经初步建立了以痘苗病毒辅助的重组HCV体外生产的体系,同时,为了便利该体系规模化应用,我们拟尝试性使用该制备体系以多种细胞系为生产细胞体外培养HCV,为该体系规模化应用提供客观依据。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM, opti-MEM培养基购自Gibco公司; 脂质体LipofectamineTM 2000购自Invitrogen公司; 小牛血清购自Hyclone公司; 胰蛋白酶、无RNA酶的DNA酶、无DNA酶的RNA酶和蛋白酶K均购自Promega公司; DNase I 购自TaKaRa; 抗NS5蛋白的鼠多克隆抗体购自Bioscience公司; HRP-兔抗鼠IgG购自博士德生物技术公司; QIAamp[®] Viral RNA提取试剂盒自Qiagen公司; HCV核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒购自广州达安试剂公司. AMV Reverse Transcriptase购自Promega公司. RNAsin购自ToYoBo公司. 重组质粒pT7HCV和pVHCV由本室构建; 重组痘苗病毒vTF7-3由冯愈博士惠赠; BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞由本室保存. GeneAmp PCR system 2400(PE公司), 自动凝胶成像分析仪(英国Syngene公司), DYY-III-5型电泳仪, DYCP-31D型电泳槽(北京六一仪器厂); 荧光定量PCR ABI Prism7000; Beckman Coulter OptimaTM L-100XP Ultracentrifuge.

1.2 方法

1.2.1 重组HCV的培养: 在六孔板中每空接种 5×10^5 个BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞, 用DMEM10培养基在37℃、50 mL/L CO₂培养箱

中培养过夜. 第2天按脂质体LipofectamineTM 2000说明书步骤将pT7HCV和pVHCV共转染细胞, 其中pT7HCV含有T7启动子和终止子控制下的HCV的全长cDNA. pVHCV含有痘苗病毒晚期启动子控制下的HCV前体蛋白开放阅读框架序列. 4 h后, 每孔加入100 μ L重组痘苗病毒vTF7-3(10^{12} PFU/L), 此重组痘苗病毒表达T7RNA聚合酶, 直接指导PT7HCV转录HCV RNA, 并且直接指导前体蛋白的表达. 2 h后, 吸去培养上清, 用无血清DMEM洗涤3次, 每孔加入4 mL DMEM2.5, 37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养. 细胞培养96 h后, 收集培养上清, 1000 r/min离心10 min, 分离上清与沉淀, 分别于-20℃冻存并检测.

1.2.2 RT-PCR检测重组HCV基因组RNA: 取细胞培养上清用0.22 μ m的滤膜过滤, 取滤过培养上清200 μ L, 加入10 U的DNA酶和20 U的RNA酶, 37℃水浴中孵育1 h, 加蛋白酶K至终浓度为100 mg/L, 37℃孵育30 min. 处理后的细胞培养上清用Qiagen病毒RNA提取试剂盒提取HCV基因组RNA, 提取物用RNAFREE的DNase于37℃水浴处理30 min以除去可能的DNA污染. 用HCV 5'-UTR的特异性引物进行PCR鉴定, 以证实质粒DNA是否彻底去除. 将提取的病毒RNA进行逆转录反应, 引物采用随机引物Random Primer 9. 应用HCV 5'-UTR的特异性引物, 将逆转录的cDNA进行PCR反应, 上游引物为5'-GCA CAA ATC CAA AAC CCC AAA GAA AAA-3'(nt 346-372), 下游引物为5'-GAC GAG CGG AAT GTA CCC CAT GAG GTC GGC-3'(nt 761-732). 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s; 35个循环, 72℃延伸10 min.

1.2.3 Western blot检测重组HCV蛋白在细胞中的表达: 培养后的细胞用胰蛋白酶消化后, 用15 mL离心管离心沉淀, 用TBST缓冲液洗涤细胞3次; 每 1×10^6 个细胞加入40 μ L SDS上样缓冲液, 100℃煮沸10 min裂解细胞, 用39 g/L浓缩胶、120 g/L分离胶进行SDS-PAGE电泳; 将电泳后的SDS-PAGE胶在冷却条件下45 V、2 h转印PVDF膜; 转印后的PVDF膜用含50 g/L脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭2 h; 封闭后的PVDF膜用TBST缓冲液洗涤 3×10 min, 加1:100稀释的抗HCV非结构蛋白NS5多抗以及加1:5000稀释的抗HCV结构蛋白E2多抗作为一抗, 4℃孵育过夜; 然后用TBST洗涤, 加1:5000稀释的HRP-兔抗鼠IgG室温孵育1 h; 然后用TBST洗涤 3×10

■相关报道

Heller *et al*已构建了较先进的HCV核酶表达系统, 该法操作简单, 但生产体系欠稳定, 产量不高。

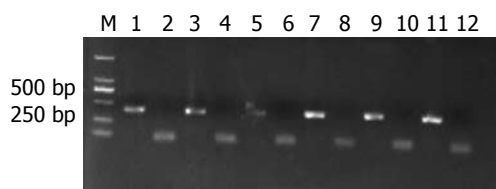


图1 人工构建的质粒PT7 HCV及PV HCV共转染BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞株后, 培养上清中HCV RNA的PCR产物凝胶电泳图。M: DL2000; 1: BHK₂₁上清未用DNA酶处理; 2-3: BHK₂₁上清用DNA酶处理后; 4: 正常BHK₂₁上清; 5: HepG2上清未用DNA酶处理; 6-7: 转染后HepG2上清用DNA酶处理后; 8: 正常HepG2上清; 9: SMMC7721上清未用DNA酶处理; 10-11: 转染后SMMC7721上清用DNA酶处理; 12: 正常SMMC7721上清。

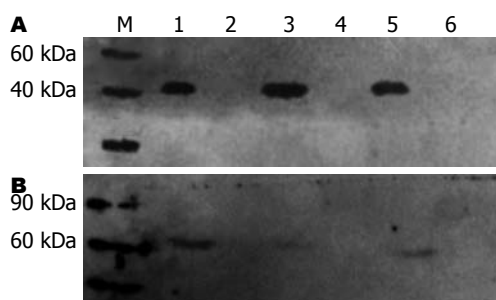


图2 HCV蛋白NS5及E2在BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞中的表达。A: NS5; B: E2。M: 蛋白Marker; 1: 共转染pT7HCV和pVHCV的BHK₂₁细胞; 2: BHK₂₁细胞; 3: 共转染pT7HCV和pVHCV的HepG2细胞; 4: HepG2细胞; 5: 共转染pT7HCV和pVHCV的SMMC7721细胞; 6: SMMC7721细胞。

min, ECL显色。

1.2.4 荧光定量PCR检测细胞培养上清中重组HCV的拷贝数: 收集细胞培养上清, RNA酶处理后取160 μ L, 用Qiagen病毒RNA提取试剂盒提取HCV基因组RNA, 提取物用RNAfree的DNase于37 $^{\circ}$ C水浴处理30 min以除去可能的DNA污染, 使用丙型肝炎病毒荧光定量PCR检测试剂盒, 用HCV 5'-UTR的特异性引物和探针PCR反应, 检测HCV基因组RNA拷贝数。

2 结果

2.1 各种细胞培养上清中HCV RNA的表达 人工构建的质粒PT7 HCV及PV HCV共转染BHK₂₁, HepG2, SMMC7721细胞株, 4 h后用痘苗病毒感染细胞, 96 h后用RT-PCR检测HCV的RNA表达。培养上清提取RNA前后均用DNase消化, PCR鉴定是否彻底除去质粒DNA的污染。结果显示: 培养上清用DNase消化前可以检测到质粒DNA的存在, DNase消化后未检测到质粒DNA。3种细胞培养上清均可以检测到HCV RNA, 而对照组细胞上清中未发现HCV RNA(图1)。

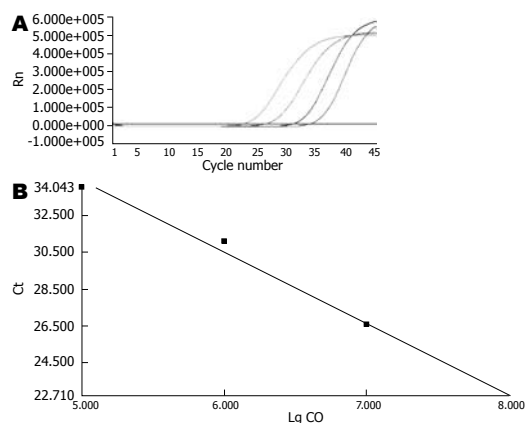


图3 FQ-PCR方法测定各种细胞培养上清中HCV的拷贝数。A: 检测丙型肝炎病毒质粒标准品中丙型肝炎病毒脱氧核糖核酸的荧光值Rn循环数变化曲线; B: 标准曲线。

2.2 各种细胞HCV结构蛋白E2和非结构蛋白NS5的免疫印迹结果 收集病毒培养细胞及上清进行蛋白质印迹鉴定, 由图2可观察到, 收集的病毒培养细胞的E2蛋白呈阳性(只感染痘苗病毒的细胞作为阴性对照), 收集的病毒培养上清的NS5蛋白呈阳性(只感染痘苗病毒的细胞上清作为阴性对照), 表明在收集的培养细胞中存在NS5蛋白, 收集的培养上清中存在E2蛋白。

2.3 FQ-PCR方法测定各种细胞培养上清中HCV的拷贝数 BHK₂₁, HepG2, SMMC7721作为HCV的生产细胞, 各细胞培养上清中HCV的拷贝数分别为 $(2.97 \pm 0.28) \times 10^7$ copies/mL, $(1.99 \pm 0.17) \times 10^5$ copies/mL, $(1.19 \pm 0.17) \times 10^5$ copies/mL(图3)。

3 讨论

HCV是输血后非甲非乙型肝炎的主要病因, 丙型肝炎呈全球性流行, 是终末期肝病的最主要原因。目前在HCV分子生物学方面^[1-6]的研究已有很大进步, 但体外大规模培养及其感染的机制、复制的方式及疫苗研制^[7]等问题尚未完全明确和解决。首先研究人员建立了复制子体外培养体系^[8-12], 但是病毒复制水平不高, 随后构建HCV的嵌合体^[13-16], 目前较先进的核酶表达系统^[17-18]体系产量仅可以达到 1×10^5 copies/mL。并且生产细胞颇具局限性, 主要以Huh-7为主, 使得体系产量在很大程度上受到生产细胞的制约。此外, Huh-7细胞不易培养, 以此系统为基础的生产体系产量欠稳定, 比较耗时^[10,17-18]。以Huh-7.5细胞株为生产细胞时, 体系产量会更高^[19], 但仍存在细胞不易培养的问题。

本研究小组已经利用并改造VV/T7^[20]瞬时

■创新盘点

本研究通过比较BHK₂₁, HepG2, SMMC7721三个生产细胞株, 拟探索生产HCV最适合的细胞株, 本系统同时也为其他RNA病毒的生产提供了一个技术平台。

■应用要点

本研究通过比较几株常用细胞株, 发现在BHK₂₁细胞中, HCV病毒颗粒产量最高, 由此为本系统的进一步应用提供客观依据。

同行评价

本研究选题新颖, 结果明确, 结论可靠, 具有较好的学术价值。

表达系统, 初步建立了痘苗病毒辅助的重组丙型肝炎病毒生产体系^[21,23]。此体系采用BHK₂₁为生产细胞, 然而由于痘苗病毒表达对于宿主细胞选择性较低^[22], 为了便利该体系的病毒制备方式, 我们拟尝试性使用多种细胞株作为生产细胞, 探索该体系生产HCV时的产量高低。

目前, 本实验室利用BHK₂₁, HepG2, SMMC7721作为生产细胞, 生产重组丙型肝炎病毒。对病毒培养上清用DNase和RNase进行处理, 去除破碎细胞中释放的质粒DNA和未被包膜蛋白包装的HCV RNA, 只有当RNA被包膜蛋白包裹才能不被RNA酶降解, 由此可以推断在培养上清中存在HCV颗粒。DNase和RNase处理后培养上清RT-PCR结果为阳性。荧光定量PCR检测到BHK₂₁, HepG2, SMMC7721上清中HCV的拷贝数分别为 $(2.97 \pm 0.28) \times 10^7$ copies/mL, $(1.99 \pm 0.17) \times 10^5$ copies/mL, $(1.19 \pm 0.17) \times 10^5$ copies/mL。本系统在以BHK₂₁为生产细胞时, 所得到的HCV的拷贝数最高, 显示本系统以BHK₂₁为生产细胞最佳, 可能BHK₂₁易于培养和繁殖, 痘苗病毒容易在该细胞中复制。

通过此研究探索, 我们发现使用比较通用的肝癌细胞系时, 该系统均有可能生产出HCV病毒颗粒, 但以BHK₂₁细胞产量最高, 提示该系统制备病毒颗粒对细胞选择性低, 由此为本系统的进一步应用提供客观依据。

参考文献

- Masante C, Mahias K, Lourenço S, Dumas E, Cahour A, Trimoulet P, Fleury H, Astier-Gin T, Ventura M. Seven nucleotide changes characteristic of the hepatitis C virus genotype 3 5' untranslated region: correlation with reduced in vitro replication. *J Gen Virol* 2008; 89: 212-221
- Pfingsten JS, Costantino DA, Kieft JS. Structural basis for ribosome recruitment and manipulation by a viral IRES RNA. *Science* 2006; 314: 1450-1454
- 赵四海, 寻萌, 楚雍烈, 朱彤, 薛欣, 徐琨, 宋娟, 邵明明. HCV全基因组培养细胞的比较蛋白组学研究. *高等学校化学学报* 2008; 11: 2174-2177
- 杨华凤, 潘明洁, 吕敏, 李越希. 丙型肝炎病毒C端截短21个氨基酸NS5B蛋白的克隆、表达及鉴定. *药物生物技术* 2008; 15: 86-89
- Kieft JS. Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 274-283
- Diviney S, Tuplin A, Struthers M, Armstrong V, Elliott RM, Simmonds P, Evans DJ. A hepatitis C virus cis-acting replication element forms a long-range RNA-RNA interaction with upstream RNA sequences in NS5B. *J Virol* 2008; 82: 9008-9022
- 杨振. 丙型肝炎疫苗的研制. *中国生物制品学杂志*

- 2008; 21: 823-826
- 刘艳, 张贺秋, 凌世淦, 祁自柏. 丙型肝炎病毒(HCV)培养模型的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志* 2005; 21: 125-127
- 高月求, 郑亚江, 王灵台. 丙型肝炎病毒细胞和动物模型研究进展. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 398-399
- Bartenschlager R. Hepatitis C virus molecular clones: from cDNA to infectious virus particles in cell culture. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 416-422
- Ali S, Pellerin C, Lamarre D, Kukolj G. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 2004; 78: 491-501
- Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset FL, Bartenschlager R. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7408-7413
- Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 997-1002
- King RW, Zecher M, Jeffries MW, Carroll DR, Parisi JM, Pasquinelli C. A cell-based model of HCV-negative-strand RNA replication utilizing a chimeric hepatitis C virus/reporter RNA template. *Antivir Chem Chemother* 2002; 13: 353-362
- 张帆, 王小红. HCV的新型体外细胞模型: 复制子系统. *第四军医大学学报* 2005; 26: 89-92
- Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology* 2008; 376: 397-407
- Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol* 2007; 81: 4405-4411
- Heller T, Saito S, Auerbach J, Williams T, Moreen TR, Jazwinski A, Cruz B, Jeurkar N, Sapp R, Luo G, Liang TJ. An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2579-2583
- Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76: 13001-13014
- Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11341-11348
- Wu YS, Feng Y, Dong WQ, Zhang YM, Li M. A vaccinia replication system for producing recombinant hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2670-2674
- Wyatt LS, Moss B, Rozenblatt S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* 1995; 210: 202-205
- 周志涛, 吴英松, 李明. 重组丙型肝炎病毒在7721细胞中的复制. *第一军医大学学报* 2005; 25: 387-390

编辑 李军亮 电编 何基才